



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3061808 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 5/071 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.11.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.08.12
(86)	European Application Nr.	16151949.1
(86)	European Filing Date	2010.02.03
(87)	The European Application's Publication Date	2016.08.31
(30)	Priority	2009.02.03, EP, 09151970 2009.09.30, EP, 09171831 2009.02.03, US, 149622 P
(84)	Designated Contracting States:	AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated Extension States:	AL ; BA ; RS
(62)	Divided application	EP2393917, 2010.02.03
(73)	Proprietor	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Kloveniersburgwal 29, 1011 JV Amsterdam, Nederland
(72)	Inventor	SATO, Toshiro, Hubrecht InstituteUppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, Nederland CLEVERS, Johannes, Carolus, Ruysdaellaan 7, 3712 AP Huis ter Heide, Nederland HUCH ORTEGA, Meritxell, Willem Barentszstraat 25II, 3572 PB Utrecht, Nederland
(74)	Agent or Attorney	OSLO PATENTKONTOR AS, Hoffsvæien 1A, 0275 OSLO, Norge

(54)	Title	CULTURE MEDIUM FOR EPITHELIAL STEM CELLS AND ORGANOIDs COMPRISING SAID STEM CELLS
------	-------	--

(56)	References Cited:	WO-A-2008/101215 WO-A2-2007/149182 JIANG J ET AL: "Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells", STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 25, no. 8, 1 August 2007 (2007-08-01) , pages 1940-1953, XP008084029, ISSN: 1066-5099 LIU Y ET AL: "A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 346, no. 1, 21 July 2006 (2006-07-21) , pages 131-139, XP024925297, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.05.086 [retrieved on 2006-07-21]
------	-------------------	---

BOOTH C ET AL: "THE ISOLATION AND CULTURE OF ADULT MOUSE COLONIC EPITHELIUM", EPITHELIAL CELL BIOLOGY, SPRINGER INTERNATIONAL, BERLIN, DE, vol. 4, no. 2, 1 January 1995 (1995-01-01) , pages 76-86, XP009006497, ISSN: 0940-9912

MONTESANO R ET AL: "COLLAGEN MATRIX PROMOTES REORGANIZATION OF PANCREATIC ENDOCRINE CELL MONO LAYERS INTO ISLET-LIKE ORGANOID", JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 97, no. 3, 1983, pages 935-939, XP002537542, ISSN: 0021-9525

BJERKNES MATTHEW ET AL: "Intestinal epithelial stem cells and progenitors", METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 419, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 337-383, XP009101698, ISSN: 0076-6879

KIM D ET AL: "IN VIVO FUNCTIONING AND TRANSPLANTABLE MATURE PANCREATIC ISLET-LIKE CELL CLUSTERS DIFFERENTIATED FROM EMBRYONIC STEM CELL", PANCREAS, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 27, no. 2, 1 August 2003 (2003-08-01) , pages E34-E41, XP009063178, ISSN : 0885-3177

ABUD H E ET AL: "Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 303, no. 2, 15 February 2005 (2005-02-15), pages 252-262, XP004709265, ISSN: 0014-4827

SATO TOSHIRO ET AL: "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche.", NATURE 14 MAY 2009, vol. 459, no. 7244, 14 May 2009 (2009-05-14), pages 262-265, XP002529277, ISSN: 1476-4687

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for dyrking av epiteliale stamceller eller et isolert vevsfragment omfattende nevnte epiteliale stamceller, hvor fremgangsmåten omfattende

5

å tilveiebringe en ekstracellulær matrise;
inkubering av nevnte epiteliale stamceller eller det isolerte vevsfragmentet omfattende nevnte epiteliale stamceller med den ekstracellulære matrisen;
10 dyrking av epiteliale stamceller eller isolert vevsfragment i nærvær av et cellekulturmedium omfattende et basalt medium for dyre eller humane celler som det er tilsatt:

15

noggin;
mellom 5 og 500 ngram/ml av en mitogen vekstfaktor valgt fra epidermal vekstfaktor (EGF), transformerende vekstfaktor alfa, fibroblast vekstfaktor (FGF), hjerneavledet nevrotrofisk faktor og keratinocyt vekstfaktor (KGF); og
en Wnt-agonist valgt fra R-spondin 1, R-spondin 2, R-spondin 3
20 og R-spondin 4.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor kulturmedium videre omfatter

25

en Rock (Rho-kinase)-inhibitor, eventuelt valgt fra Y-27632, Fasudil og H-1152; og/eller
en notch-agonist.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor fremgangsmåten er for å dyrke et organoid, hvor organoidet omfatter epiteliale stamceller.

30

4. Fremgangsmåte for å oppnå et pankreas-organoid ved dyrking av pankreas epiteliale stamceller, eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, ved anvendelse av en fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor trinnet med dyrking omfatter

35

- dyrking av nevnte epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende epiteliale stamceller i kontakt med en ekstracellulær matrise i et første

- trinn i et medium omfattende Noggin, EGF og KGF eller FGF, og R-spondin 1 som Wnt-agonist, supplert med B27, N2, og/eller N-Acetylcystein, og eventuelt videre omfattende gastrin, exendin og nikotinamid, og
- 5 - deretter i et andre trinn i et medium omfattende EGF og KGF eller FGF, og R-spondin 1 som Wnt-agonist, supplert med B27, N2 og/eller N-Acetylcystein.
5. Fremgangsmåte for å oppnå et gastrisk organoid ved dyrking av gastriske
- 10 epiteliale stamceller, eller vevsfragmenter omfattende nevnte epiteliale stamceller, ved anvendelse av en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvor trinnet med dyrking omfatter
- 15 - dyrking av nevnte gastriske epiteliale stamceller eller vevsfragmenter omfattende nevnte gastriske epiteliale stamceller i kontakt med en ekstracellulær matrise i et første trinn i et første medium omfattende Noggin, EGF og FGF10, R-spondin 1 og Wnt-3a som Wnt-agonist, og videre omfattende B27, N2 og/eller N-Acetylcystein, og
- 20 - deretter i et andre trinn i et medium hvor medium er identisk med det første medium bortsett fra at konsentrasjonen av Wnt-3a reduseres i det andre trinnet sammenlignet med Wnt-3a-konsentrasjonen som er til stede i det første trinn.
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor den
- 25 ekstracellulære matrisen omfatter et kollagen og laminin.
7. Tredimensjonalt vevsorganoid, hvor organoidet bevarer nærværet av epiteliale stamceller som har en udifferensiert fenotype og selvvedlikeholdsevner, hvor ikke-epiteliale celler er fraværende fra nevnte organoidet, og hvor nevnte
- 30 organoidet er oppnåelig ved en fremgangsmåte som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 6.
8. Samling av mer enn 10 organoider, som definert i krav 7.
- 35 9. Anvendelse av organoidet ifølge krav 7, eller samling av organoider ifølge krav 8, i et *in vitro*-legemiddelfunn screening eller toksisitetsanalyse.

10. Organoid ifølge krav 7, eller samling av organoider ifølge krav 8, for anvendelse i regenerativ medisin.